

DIE HISTOCHEMISCHE BESTIMMUNG
DES ZINK-GEHALTES IN LEUKOZYTEN
BEI CARCINOM-KRANKEN

Kritische Studie zu einer als "Krebsfrühreaktion" angegebenen Methode

GERHILD NEUMANN

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Klinik des
Oldenburgischen Landeskrankenhauses Sanderbusch
(Direktor: Professor Dr. med. D. Mohring)
und I. Medizinischen Universitätsklinik Mainz

DIE HISTOCHEMISCHE BESTIMMUNG
DES ZINK-GEHALTES IN LEUKOZYTEN
BEI CARCINOM-KRANKEN

Kritische Studie zu einer als "Krebsfrühreaktion" angegebenen Methode

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

GERHILD NEUMANN
aus Reichenberg (Sudeten)

Fachbereichs-Dekan:

Professor Dr. J. Fischer

Referent:

Professor Dr. med. D. Mohring,
Medizinische Klinik des Oldenburgischen
Landeskrankenhauses, 2945 Sanderbusch

Korreferent:

Professor Dr. med. J. Fischer,
I. Medizinische Universitätsklinik, 65 Mainz

Tag der mündlichen Prüfung:

15. Mai 1974

Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLCHEN 1 · RUF 0 6132/5711



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Physiologie und Pathophysiologie des Zink-Stoff- wechsels im menschlichen Blut	4
1. Aufnahme, Resorption und Verteilung von Zink	4
2. Zink im Blut und seinen geformten Bestandteilen	5
3. Die biologische Rolle des Zinks	7
4. Zinkverhalten bei Malignomen	9
III. Experimenteller Teil	12
1. Patientengut	12
2. Gewinnung der Leukozyten	14
3. Färbemethode	14
4. Zählmethode	18
5. Ergebnisse	19
IV. Diskussion	23
V. Zusammenfassung	32
VI. Literaturverzeichnis	34

I. Einteilung und Problemstellung

Die Suche nach einer einfachen und zuverlässigen humoralen Methode zur möglichst frühzeitigen Erkennung einer Krebserkrankung führte zur Publikation einer fast unübersehbaren Zahl sogenannter "Krebsfrühreaktionen", für die nahezu alle in der Medizin bekannten Methoden und Verfahren herangezogen wurden, wobei das Schwergewicht eindeutig auf Untersuchungen des Blutes bzw. seiner Bestandteile lag (26, 38).

Bisher konnte jedoch keines der mitgeteilten Verfahren eine signifikante und spezifische Veränderung der Blutzusammensetzung oder einzelner diagnostisch zugänglicher Stoffwechselleistungen durch eine noch streng lokalisierte, d.h. noch in der Entwicklung begriffene, Krebserkrankung aufdecken, geschweige denn serologische Vorgänge aufzeigen, die einer etwaigen Krebsentwicklung vorausgehen.

Alle verwertbaren diagnostischen Hilfsmittel werden bisher erst dann relevant, wenn die Krebserkrankung bereits zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Mitreaktionen des Organismus geführt hat.

Rein theoretisch könnten unter Berücksichtigung eines Tumorstoffwechsels zwei Möglichkeiten zur Krebsfrühdiagnose führen:

- (I) Durch den Nachweis von spezifischen Stoffwechselprodukten der Tumorzelle selbst.

Dieses wird bereits bei einigen wenigen Tumorarten diagnostisch ausgenutzt, wie z.B. die Vermehrung der sauren Phosphatase im Serum beim Prostata-Carcinom, das Auftreten von bestimmten Paraproteinen beim Plasmazytom, die Steigerung der Serotoninausscheidung (bzw. seiner Metaboliten) im Harn beim Carcinoid, wie auch die spezielle Vermehrung einer Hormonausscheidung bei anderen (hormonbildenden) Tumoren, z.B. Conn-Syndrom etc..

- (II) Der Nachweis von tumorspezifischen Reaktionsprodukten des befallenen Gesamtorganismus.

Die hierfür herangezogenen Nachweismethoden müßten folgende Voraussetzungen erfüllen:

1. Hohe Spezifität
2. Reproduzierbarkeit
3. Ausreichend hohe Empfindlichkeit
4. Relativ einfache Handhabung

Auf diesem Gebiet fehlen uns jedoch bis heute hinreichende befriedigende, den Kriterien 1 - 4 entsprechende humorale Hinweise. Einzelne Verfahren, wie z.B. der Nachweis bestimmter immunoelektrophoretischer Konstellationen der Serum-Eiweiße, eine Erhöhung der Laktatdehydrogenase im Serum, genügen den Kriterien 2 - 4, die Spezifität ist jedoch so relativ gering, daß im Einzelfall allenfalls in Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild ein stärkerer Tumorverdacht berechtigt sein mag.

Unter im Prinzip die gleichen Kriterien der Gruppe II fallen aber auch Versuche, in den geformten Blutbestandteilen des Menschen tumorspezifische Alterationen der Struktur oder des Zellmetabolismus nachzuweisen, wozu auch die hier abzuhandelnden Zink-Reaktionen am Granulozyten gehören.

Zink ist als Reaktionspartner verschiedenster enzymatischer Stoffwechselprozesse schon länger bekannt, in letzter Zeit wurde es darüberhinaus auch im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen mehrfach untersucht, wobei z.B. quantitative Veränderungen im Serum, in den Erythrozyten und Leukozyten beschrieben wurden.

Auf einen relativ hohen Zink-Gehalt des einzelnen Leukozyten wies erstmals VALLEE (99) 1948 hin, nachdem die Entwicklung hochwertiger Meßmethoden genaue Analysen zuließ. VALLEE (99) hatte nach mehreren Voruntersuchungen (15, 34, 42) eine Methode zur quantitativen Zink-Bestimmung verfeinert, mit der unter Benutzung eines Komplexpuffers und des durch FISCHER (27) bekanntgewordenen Dithizons nach Veraschung des zinkhaltigen Materials kolorimetrisch Zink-Mengen bis zu $1\mu\text{g}$ erfaßt werden können. Wenig später fanden jedoch GIBSON und VALLEE (33) unter Verwendung der gleichen Methodik eine auffällige Erniedrigung des Leukozyten-Zink-Gehaltes bei myeloischer und lymphatischer Leukämie, während die Serum-Zinkwerte bei den untersuchten Patienten unverändert im Normbereich lagen.

Als MC NARY (63) - nach Vorversuchen mit anderen Dithizon-Gemischen (59) - mit einem Dithizon-Azeton-Wassergemisch im Prinzip ähnlich gelagerte Färbeversuche am normalen und leukämischen Granulozyten anstellte, glaubte er in den leukämischen Zellen weniger Granula angefärbt zu sehen als in den gesunden Zellen.

Diese Beobachtung wurde in der Folgezeit von vielen Autoren durch den verminderten Zink-Gehalt leukämischer Zellen erklärt, gleichzeitig wurde mit dieser technisch weniger aufwendigen Methode der Gehalt des Zinks in den Leukozyten bei an anderen Malignomen Erkrankten untersucht. Übereinstimmend wurde von ihnen ein Absinken des

zinkpositiven Materials in den Leukozyten Tumorkranker gefunden und damit schien die Annahme nahezuliegen, mit einer relativ einfachen Methodik - nämlich über den Nachweis eines Absinkens des Leukozyten-Zinkgehaltes - eine carcinomtypische "humorale" Reaktion gefunden zu haben.

Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war es, unter Bezug auf die vorangegangenen Publikationen eigene weitere Erfahrungen darüber zu sammeln, ob und mit welcher Zuverlässigkeit die eingangs ausgeführten methodischen Kriterien eines sogenannten Krebsfrühtestes erfüllt seien. Es stellte sich dann aber bald heraus, daß eine Verminderung der "zinkpositiven" Granula in den Leukozyten auch bei extremster Krebskachexie nicht reproduziert werden konnte.

Wir mußten uns daher in diesem Augenblick die Frage stellen, ob methodische Fehler o.ä. für unsere gänzlich andersartigen Befunde verantwortlich waren.

Bei dem nun sehr kritischen Quellenstudium und einer subtilen Überprüfung der Methode selbst stellte sich schon bald heraus, daß unabhängig von einer fraglichen Tumorabhängigkeit mit diesem Verfahren eine Spezifität für Zink nicht gegeben war. Nach Einstellung der Methode auf einen für Zink spezifischen Bereich, fehlte das zur semiquantitativen Bestimmung auszuzählende "zinkpositive" Granulamaterial.

Es wurde somit letztlich zur Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit, sich kritisch mit einer vielfach als histochemisch geeignet bezeichneten Methode auseinanderzusetzen.

II. PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DES ZINK-STOFFWECHSELS

1. Aufnahme, Resorption und Verteilung

Der Gesamt-Zink-Gehalt des menschlichen Körpers wurde mit ungefähr 1,36 - 2,32 g bestimmt (34 a, 37, 88, 104, 105), der Durchschnittsgehalt der einzelnen Gewebsarten beträgt 30 - 50 $\mu\text{g/g}$, wobei Organe mit hohem Zink-Umsatz - wie Leber, Niere, Pankreas und endokrine Drüsen - von Organen mit niederem Zink-Umsatz, wie Knochen, Muskulatur und ZNS getrennt werden können (117). Damit steht im Hinblick auf das Körpergewicht Zink mit $3,3 \times 10^{-3} \%$ nach Eisen (mit $6,0 \times 10^{-3} \%$) an der zweiten Stelle der Spurelemente - vor Kupfer (mit $1,4 \times 10^{-4} \%$) (87).

Die tägliche Zink-Zufuhr über die Ernährung beträgt 10 - 15 mg, wovon allerdings der größte Teil (5 - 10 mg) nicht resorbiert wird (37). Da Zink praktisch in allen Nahrungsmitteln vorhanden ist, muß bei normaler Kost die Zink-Zufuhr als gewährleistet angesehen werden. Oral zugeführtes Zink wird besonders im oberen Dünndarmabschnitt resorbiert (59, 117); exakte Informationen über den eigentlichen Resorptionsmechanismus vom Darm-lumen zum Blut fehlen jedoch bisher (14, 86, 117). Möglicherweise benutzen Eisen und Zink ähnliche Resorptionsmechanismen, bei der Verfrühtung eines Zink-Überschusses kam es bei Versuchen mit Ratten zur Bildung eines eisenarmen Ferritins in der Leber (14).

Die Ausscheidung erfolgt, wie Untersuchungen mit radioaktivem Zink zeigten, hauptsächlich mit den Faeces, ganz gleich, ob es per os oder injektionen zugeführt wurde (62). Es gelangen täglich ungefähr 5 - 10 mg über Pankreas- und Gallensaft sowie über das obere Dünndarm-epithel in das Intestinum (37). MÄGLER [59] fand nach intravenöser Verabreichung von Zinkacetat mittels Dithizon-Färbung eine erhebliche Zunahme von intrazellulärem Zink-Einschlüssen in den Dünne- und Dickdarmepithellen. Der größte Teil aus in der Lumen enthaltenen Zinks ist nicht resorbierbares färbungsfähiges Zink, nur ein kleiner Teil entsteht als Zink, das vom Organismus nach erfolgter Resorption als Zink in die Zelle und Pankreas in den Harn ausgeschieden wurde (59). Als Zink-Zufuhr mit der Nahrung (10 mg) und (10 - 15 mg) die Niere für mg/mg konstante regulierte Ausscheidung (Harn) ist. Als Zink-Zufuhr mit der Nahrung (10 mg) steigt die Konzentration im Harn nicht an (18, 62).

Die Zink-Mangelkrankung zeigt bei Pflanzen, Tieren und Menschen charakteristischen reversiblen Veränderungen (103). Zwergwuchs, Chlorophylldefekte und Blatt-

mißbildungen traten bei Pflanzen auf, die unter Zink-Entzug aufwuchsen. Bei Tieren, die von Geburt an zinkfrei ernährt wurden, standen zunehmende Retardierung des Wachstums, Hypogonadismus sowie Hyper- und Parakeratosen der Haut und Schleimhäute im Vordergrund, dazu kamen - je nach Dauer, Schwere und Lebensalter - Erscheinungen wie Anorexie, Erbrechen, Hypoproteinämie und Anämie (80, 93, 103, 115). Bei einigen Mikroorganismen wurde durch zinkfreie Nährböden eine erhebliche Verzögerung des Wachstums der Kulturen hervorgerufen, dabei waren einzelne Enzymaktivitäten stark vermindert und - wie bei allen Zinkmangelercheinungen - nach Zinkgabe reversibel (37).

2. Zink im Blut und seinen geformten Bestandteilen

Der Zinkgehalt des Vollblutes wurde mit $6 - 9 \mu\text{g}/\text{ml}$ bestimmt (8, 100, 107), 75 % davon finden sich in den Erythrozyten, 22 % im Serum und 3 % in den Leukozyten (100), der einzelne Leukozyt enthält 25 mal mehr als der einzelne Erythrozyt. Absolut enthalten die Erythrozyten $0,97 \pm 2,0 \mu\text{g}/10^9$ Zellen (22) und die Leukozyten $14,2 \pm 2,0 \mu\text{g}/10^9$ Zellen.

In den Erythrozyten ist der überwiegende Zink-Anteil an die Carboanhydrase gebunden (103), ein geringerer Teil scheint an Dehydrogenasen gekoppelt (105).

Bei allen Anämieformen - außer der Perniciosa - ist sowohl der Zink- als auch der Carboanhydraseanteil vermindert, die Zinkabnahme geht der Erythrozytenzahl, dem Haematokritwert und dem Haemoglobingehalt annähernd parallel (98, 104). Bei der perniziösen Anämie wird eine deutliche Vermehrung des Zink- und Carboanhydrasegehaltes sowie der Haemoglobinkonzentration gefunden (106, 117). Angesichts des bekannten Zink-Gehaltes der prosthetischen Gruppe der Carboanhydrase kann die Zinkvermehrung in den Erythrozyten bei der Perniciosa (um 100 - 500 %) als Folge der Carboanhydraseanreicherung angesehen werden (116).

Bei Neugeborenen ist die Zink-Konzentration in den Erythrozyten niedriger als bei der Mutter.

BERFENSTAM (8) bestimmte den Erythrozyten-Zink-Gehalt im Nabelschnurblut mit durchschnittlich $3,76 \times 10^2 \mu\text{g}/\%$; für 4 - 11 Monate alte Säuglinge lag dieser Wert bei $7,27 \times 10^2 \mu\text{g}/\%$; im Alter von 1 - 5 Jahren stieg er auf ca. $10,55 \times 10^2 \mu\text{g}/\%$, um in der Pubertät wie beim Erwachsenen durchschnittliche Werte von $12,44 \times 10^2 \mu\text{g}/\%$ zu erreichen. Den Serum-Zinkwert bestimmten mehrere Autoren mit $100 - 160 \mu\text{g}/\%$ mit einem Mittelwert von $130 \mu\text{g}/\%$ (8, 10, 101 - 107, 110), nach neuesten Untersuchungen mit den Atom-

spektralphotometrie wurden Werte von $76 - 125 \mu\text{g}/\%$ gefunden (19), bei PASCHEN (76) beträgt dieser Wert $95 - 130 \mu\text{g}/\%$.

DAVIES (19) stellte einen Abfall der Serumwerte nach oraler oder intravenöser Gabe von Glukose fest und betont, daß es sich hierbei nicht um eine Verdünnungserscheinung handelt.

Es wird eine lockere und eine fester gebundene Form des Serum-Zinks unterschieden, das locker gebundene Serum-Zink ist durch Dithizon-Azeton extrahierbar (107) oder durch Absorption an Aluminiumoxyd abspaltbar (107, 113), was mit dem fest gebundenen Serum-Zink nicht durchführbar ist.

Etwa 60 % des Serum-Zinks sind locker, ca. 40 % fest an Eiweißkörper gebunden.

Nach elektrophoretischer Aufgliederung erscheinen die lockeren 60 % vorwiegend an Albumine gekoppelt und werden als Metallprotein Komplexe der Transportform des Zinks zugeordnet (116, 117).

Die fest gebundene Form erschien im α_1 und α_2 - Globulinbereich mit unbekannter biologischer Funktion. Ein spezifisches Trägereiweiß - wie das β_1 - Globulin (Transferrin) für Eisen - scheint für Zink nicht zu existieren (115). An pathologischen Veränderungen des Serum-Zinks ist sowohl die locker als auch die fest gebundene Fraktion beteiligt (116).

In den Thrombozyten wurde der Zink-Gehalt mit $0,20 - 0,45 \mu\text{g je } 10^9$ Zellen oder $4,6 - 26,3 \mu\text{g je } 100 \text{ ml Blut}$ bestimmt. Mit diesem Zink-Gehalt der Thrombozyten erklärt FOLEY (30) in der Hauptsache den Unterschied im Zink-Gehalt von Serum und Plasma (7,1 %), während die Volumendifferenz (6,2 %) und Hämolyse (0,6 %) weitere Ursachen dafür sind.

In den Leukozyten wurde die Konzentration des Zinks mit durchschnittlich $14,2 \pm 2,0 \mu\text{g je } 10^9$ Zellen angegeben (22), bei anderen Autoren findet man $16,0 \pm 8,4 \mu\text{g je } 10^9$ Zellen (60), $20,20 - 40 \mu\text{g je } 10^9$ Zellen (33) und $10,3 \pm 2,5 \mu\text{g je } 10^9$ Zellen (103).

Bei reinen Eosinophilenkonzentraten wurden Werte von $251,8 \mu\text{g}/10^9$ Zellen gefunden (116).

Bei histochemischen Untersuchungen im Knochenmark enthalten in der myeloischen Reihe normalerweise von der Reifestufe eines Metamyelozyten an) Zellen mit steigender Reife zunehmend mehr Zink (37, 95, 96).

Der Leukozyten-Zink ist nach VALLEE (103) an ein Protein gebunden, das möglicherweise Enzymatisches, aber nicht der Carboanhydrase entspricht. Hoch ist dagegen der Gehalt der Leukozyten an alkalischer Phosphatase, nach CRAM und ROSSITER (16) tausendmal höher als im Serum, darüber hinaus beschrieb MATHIES (61) die alkalische Phosphata-

se der Schweineniere als ein Zink-Metallenzym, so daß das hohe Zink-Vorkommen in den Leukozyten mit der alkalischen Phosphatase in Zusammenhang gebracht werden könnte.

Auffällig sind in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse von BECK und VALENTIN (7), die eine Abnahme der alkalischen Phosphatase bei chronischer und akuter Leukämie fanden, was sich dann mit den Ergebnissen von VALLEE und GIBSON (101) deckt, die bei diesen Erkrankungen das Abnehmen des Zink-Gehaltes in den Leukozyten fanden, wenn Zink als Bestandteil des Metallenzym Phosphatase gesehen wird.

Bei soliden malignen Tumoren fanden LAMBERS (53, 54) und OSTEN (73) dagegen die Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Leukozyten meist erhöht, sie wiesen allerdings auf das wechselnde Verhalten bei anderen Untersuchern hin.

Der hohe Zink-Gehalt der Leukozyten muß sich nicht durch ein Metallenzym allein erklären. Ein weiteres Ferment in den Leukozyten mit Zink als Co-Faktor beschrieb FLEISCHER (29). Er fand eine Peptidase zur Hydrolyse von Glycyl-1-leuzin, aber auch diese Tatsache allein erklärt den hohen Zink-Gehalt der Leukozyten nicht.

Auch weiß man von diesem Ferment nicht, ob seine Aktivität bei Leukämien gleichfalls abnimmt und unter der Norm liegt, wie es vom Gesamt-Zink-Gehalt bekannt ist (93, 103). VALLEE (103) fand nämlich keine Beziehung zwischen dem Verhalten des Zink-Gehaltes der Leukozyten und den Fermenten Alkoholdehydrogenase, Carboxypeptidase, Lactatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase, die auch nach SUND (93) Zink-Metalloenzyme darstellen (Tab. I).

3. Die biologische Rolle des Zinks

Einen orientierenden Überblick der biologischen Rolle des Zinks gibt WOLFF (117). Er unterscheidet grundsätzlich drei Möglichkeiten:

a. Eine Beteiligung von Zink-Atomen am Aufbau von Metalloenzymen, die bei Entfernung des Zink-Anteils auch ihre biologische Wirksamkeit verlieren. Die bekannten zinkhaltigen Metalloenzyme sind in Tabelle I zusammengestellt.

Das im Hinblick auf seinen Zinkanteil am längsten bekannte Enzym dieser Gruppe ist die Carboanhydrase, die in den Erythrozyten den alveolären Gasaustausch und in den Belegzellen des Magens die Sekretion der Salzsäure katalysiert, gleichzeitig ist die Carboanhydrase in den distalen Tubuluszellen unerlässlich zur Lieferung von H-Ionen für die Rückresorption von Natrium im Austausch gegen Wasserstoff.

Tabelle I

Größe und Zink-Gehalt von Zink-Enzymen

Enzym	Molekulargewicht	Zinkgehalt (Mol Zn^{++} pro Mol Enzym)
ADH aus:		
Hefe	150 000	3,2-5,9
Pferdeleber	84 000	2-4
Humanleber	87 000	2,2
3-Phosphoglycerinaldehyd- dehydrogenase aus Schweinskelettmuskel ..	140 000	2,8
Carboanhydratase aus:		
Rindererythrocyten	30 000	1
Mensch erythrocyten ...	30 000	1
Carboxypeptidase aus Rinderpancreas	34 000	1
Neutrale Proteinase aus Bacillus subtilis	30 000-40 000	1
Alkalische Phosphatase aus Escherichia coli K 12	80 000	2,1
α -Amylase aus Bacillus sub- tilis	97 000	1

Aus H. SUND (93) Zink-Enzyme: Funktion und Struktur.

b) Eine unspezifische Aktivierung verschiedener Fermentsysteme durch Zink-Ionen, die allerdings mit dem gleichen biologischen Effekt auch gegen andere Schwermetalle wie Mg, Mn, Co oder Fe ausgetauscht werden können.

c) Eine Bildung schwer löslicher Zink-Komplexe mit Proteohormonen als Depotform, aus der der Wirkstoff bei Bedarf durch den physiologischen Reiz freigesetzt wird. Am bekanntesten ist für diesen Mechanismus die Bindung von Zink und Insulin in den β -Zellen des Pankreas, die durch intravitale Dithionzuzufuhr als purpurrote Zink-Dithionzunkomplex-Bindung sichtbar gemacht werden kann (91, 111, 112, 114, 120). Ähnliche Beziehungen bestehen zwischen Zink und Glucagon in den zinkreichen α -Zellen (85, 118) und zwischen Zink und ACTH im Hypophysenvorderlappen (10, 43); bei der Herstellung zinkhaltiger Depot-Präparate von Insulin und ACTH wurde dieser Tatsache im übrigen Rechnung getragen.

Neueste Untersuchungen lassen auch auf eine Rolle des Zinks bei der Protein- und RNS-Synthese sowie bei der Stabilisierung der Tertiärstruktur von Makromolekülen wie RNS und DNS schließen (37, 75, 81, 105, 117).

4. Zink-Verhalten bei Malignomen

Ein sicheres Ansteigen des durchschnittlichen Zink-Gehaltes in malignen Tumoren wurde erstmals von DOLEZENNE (25) 1919 beschrieben, weitere Untersuchungen mit ⁶⁵Zn bestätigten diese Ergebnisse (50, 116); der gesteigerte Stoffwechsel mit hohem Enzymgehalt und gesteigerter DNS-Synthese wurden hierfür als Erklärung herangezogen (37, 116).

Von anderer Seite (17) wird nur die starke Vermehrung des Kalium-Gehaltes in der Tumorzelle hervorgehoben, wogegen die übrigen anorganischen Elemente - wie die als Enzymbestandteile bekannten Spurelemente Kupfer, Zink und Mangan - keine konstante oder charakteristische Abweichung zeigten.

Dagegen ist eine erhebliche Anhäufung von Milchsäure durch die enorm hohe aerobe Glykolyse und eine starke Verminderung der Katalaseaktivität für die Tumorzelle spezifisch (17).

Um die Bedeutung des Zinks für die Tumorzelle zu demonstrieren, wurden von verschiedenen Untersuchern Versuche unter zinkfreien Bedingungen aufgestellt. Ähnlich den beobachteten Mangelerscheinungen gesunder Tiere nach zinkfreier Diät (80, 94, 105, 117) wurde dabei auch ein Wachstumsstillstand überimpfter maligner Tumoren (Walker-256-Karzinom) nach Zink-Entzug festgestellt (23, 24, 64).

POSWILLO (79) fand etwa gleichlautend bei zinkfrei ernährten Tieren nach regelmäßiger Ätzung mit karzinogenen Substanzen eine deutlich verminderte Ausbildung von Hautkrebsen. Dieser krebshemmende Effekt des Zinks wird hervorgehoben, bleibt aber ungeklärt.

Versuche an isolierten Tumorzellen führte OTSUKA (74) durch. Er fand gleichfalls eher einen hemmenden Einfluß von Zink und Mangan auf die DNS-Synthese von Sarkomzellen in Gegenwart von Leberextrakten.

Veränderungen des normalen Zink-Verhaltens im Serum bei den verschiedenen Erkrankungen sind nach Entwicklung nochempfindlicher Meßmethoden von vielen Untersuchern beschrieben worden (3, 18, 35, 36, 37, 46, 56, 66, 70, 83, 93, 97, 116).

Eine Übersicht wird mit Tabelle II gegeben.

Ursächliche Faktoren wurden überwiegend nur hypothetisch angegeben, das kurzfristige Ansteigen des Serum-Zinkes bei Tumor-Patienten nach RÖ-Bestrahlung scheint auf eine Aktivierung des parasitären Zellstoffwechsels zu beruhen, das Abnehmen des Serum-Zinkes bei Infekten und lokalen Entzündungen ist noch ungeklärt (116).

Tabelle II

Veränderungen der Serum-Zink-Werte bei verschiedensten Erkrankungen

Gruppe Nr.	Krankheit	Zahl der Fälle	Mittleres Serumzink
A. Erhöhung des Serumzinks			
1	Experimentelles Fieber (Pyrid.)	8	192
2	Polycythaemia vera	6	170
3	Hyperthyreose	26	169
4	Essentielle Hypertonie	66	164
5	Eosinophilie des Blutes (>15% Eos.)	14	145
6	Anbehandelte Perniciosa (I. - VIII. Tag)	12	146
B. Senkungen des Serumzinks			
7	Akute Blutungsanämie	18	123
8	Chronische Lymphadenose	11	117
9	Essentielle hypochrome Anämie	10	115
10	Chronische Blutungsanämie	14	112
11	Chlorose	3	108
12	Achyilia gastrica	15	105
13	Sarkome und Carcinome	45	104
14	Morbus Addison	5	103
15	Akute Myelose	10	102
16	Kompensierte Lebercirrhose	10	102
17	Akute Glomerulonephritis	8	102
18	Chronische Myelose	20	101
19	Lymphogranulomatose	16	101
20	Chronische Infekte	39	100
21	Hepatitis acuta	26	100
22	SIMMONDSche Kachexie	2	98
23	Verchiluliktaria	12	97
24	Akute Infekte	41	96
25	Kardialer Hydrops	13	92
26	Myxödem	17	92
27	Unbehandelte Perniciosa	16	91
28	Chronische Glomerulonephritis	16	83
29	Dekompensierte Lebercirrhose	10	82

Aus H. P. WOLFF: Untersuchungen zur Pathophysiologie des Zink-Stoffwechsels (116).

Das Verhalten der Serum-Zink-Konzentration bei malignen Erkrankungen wird überwiegend gleichlautend angegeben. WOLFF (116) fand bei 45 Patienten mit Sarkomen und Carcinomen ein signifikantes Absinken auf durchschnittlich 104 $\mu\text{g}/\%$ gegenüber der Norm von 130 $\mu\text{g}/\%$ (Tab. II, S. 10); elektrophoretische Untersuchungen gaben dabei keine Hinweise auf eine Änderung des Verteilungsmodus der zinkbindenden Eiweißfraktionen bei Abnahme des Serum-Zinks.

DAVIES 18, 19 fand mit der Atom-Absorptionsphotometrie in Untersuchungen an 88 Carcinomträgern nur bei 39 Patienten mit Bronchial-Carcinom eine signifikante Erniedrigung der Plasma-Zink-Werte von 95 $\mu\text{g}/\%$ $\pm$ 13 auf 72 $\mu\text{g}/\%$ $\pm$ 11,5, die übrigen 49 Carcinomträger, die nicht näher aufgeteilt wurden, wiesen normale Plasma-Zink-Werte auf.

Auch ROSNER (84) beschrieb mit einem gleichen Verfahren ein signifikantes Absinken des Serum-Zinks bei Morbus Hodgkin sowie bei chronisch lymphatischer Leukämie.

Bei AUERBACH (6) liegen alle Serum-Zink-Werte von 11 Hodgkin-Patienten unter dem Normbereich, KOCH (50) dagegen beobachtete bei 40 % seiner 28 Hodgkin-Patienten ein Ansteigen der Serum-Zink-Werte über den Normalwert.

Das Absinken des Leukozyten-Zinks wurde übereinstimmend nach Veraschung, Extraktion mit Dithizon und kolometrischer Bestimmung von mehreren Autoren bei Leukämien gefunden (21, 22, 31, 33) und später mit anderen differenzierten Methoden bestätigt (116).

Das Absinken des Leukozyten-Zinks mit der semiquantitativen Methode nach MC NARY (63) und SZMIGIELSKI (95, 96) wurde für Tumoren des Hals-Nasen-Ohren-Bereiches von BRUNNER und FRÜHWALD (9) beschrieben. Bei verschiedensten Blutkrankheiten fand SZMIGIELSKI (95) eine deutliche Abnahme des "zinkpositiven" Materials in den Leukozyten, Beobachtungen, die sich auch bei anderen Carcinomen machen ließen (4, 44, 51, 55, 96, 108, 109).

Diese gleichlautenden Ergebnisse schienen die semiquantitative Zink-Bestimmung in Leukozyten mittels Dithizon-Azeton-Wasser-Gemischen zu einer Methodik werden zu lassen, schon frühzeitig tumorspezifische Reaktionsprozesse des Organismus - im Sinne der eingangs zitierten "Krebsfrühreaktion" - erfassen zu können.

Exakte quantitative Bestimmungen des Leukozyten-Zinks bei Malignomen - ähnlich den Untersuchungen durch Veraschung von Leukozytenkonzentraten von GIBSON und VALLEE (33) - liegen dagegen z.Z. nicht vor.

III. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Patientengut

Es wurden Blutausstriche von 40 Patienten mit jeweils gesicherten soliden Carcinomen, sowie von 14 gynäkologischen Carcinom-Frühfällen und 16 Gesunden untersucht.

Tabelle III enthält die verschiedenen Tumorarten, die Dauer der Erkrankung bis zum Zeitpunkt der hier beschriebenen histochemischen Untersuchung und die jeweils gefundenen Granulawerte.

Im Interesse einer möglichst breiten Beurteilbarkeit der Methodik wurden hierbei sowohl Tumor-Patienten berücksichtigt, die keinerlei Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens zeigten, wie auch einige fast bis zur terminalen Kachexie fortgeschrittene Erkrankungsfälle.

Auf der anderen Seite war es aus der Thematik heraus verständlich, daß besonderer Wert auch auf die Untersuchungen von Frühfällen gelegt wurde.

Bei diesen Frühfällen handelt es sich um gynäkologische Frühfälle des Portio-Carcinoms der Gruppe O, der sog. Oberflächen-Carcinome oder präinvasiven Carcinome mit kolposkopisch suspektem Befund. Dieses Kollektiv umfaßt 14 Fälle.

Alle Patienten waren z.Z. der Blutuntersuchung frei von Zweiterkrankungen, fieberhaften Infekten und lokalen Entzündungen (36, 60, 116), insbesondere ohne diabetische Stoffwechsellaage und ohne allergische Reaktionen.

Auch bei den zur Kontrolle herangezogenen Personen trat innerhalb eines Zeitraumes von 2 Wochen nach der Untersuchung keine Erkrankung auf.

Zinkhaltige Medikamente wurden nicht appliziert, die Blutentnahme erfolgte morgens am nüchternen Patienten (18, 19).

Zur Festlegung der Normalwerte wurden Blutausstriche 16 gesunder Personen ausgewertet, es hatten sich hierzu Kollegen und Krankenschwestern im Alter von 18 - 24 Jahren zur Verfügung gestellt.

Tabelle III

Zusammenstellung der 40 Patienten mit soliden Tumoren

Pat.-Nr.	Alter i. J.	Diagnose	Periode zw. Diagn.-St. u. unserer Unters. in Monaten	Granula
1	37	Cervix-Ca. Stad. I	-	210
2	45	Cervix-Ca. Stad. I	2	180
3	28	Cervix-Ca. Stad. I	2	181
4	32	Cervix-Ca. Stad. I	4	200
5	49	Cervix-Ca. Stad. I	1	185
6	54	Cervix-Ca. Stad. I	2	202
7	54	Cervix-Ca. Stad. II	3	204
8	40	Cervix-Ca. Stad. II	3	201
9	48	Cervix-Ca. Stad. II	6	211
10	49	Cervix-Ca. Stad. II	7	213
11	32	Cervix-Ca. Stad. IV	-	191
12	54	Cervix-Ca. Stad. IV	-	200
13	67	Vulva-Ca.	-	185
14	69	Vulva-Ca.	1	194
15	35	Mamma-Ca. Steintal I	-	221
16	37	Mamma-Ca. Steintal I	-	196
17	38	Mamma-Ca. Steintal III	6	142
18	42	Mamma-Ca. Steintal III	8	167
19	42	Rectum-Ca.	3	164
20	56	Rectum-Ca.	3	218
21	75	Rectum-Ca.	-	181
22	64	Rectum-Ca.	1	182
23	24	Rectum-Ca.	-	200
24	52	Bronchial-Ca.	-	173
25	53	Bronchial-Ca.	3	175
26	75	Bronchial-Ca.	14	194
27	75	Carcinoma vesicae	-	160
28	68	Carcinoma ventriculi	2	186
29	69	Carcinoma ventriculi	-	199
30	32	Morbus Hodgkin	24	174
31	47	Morbus Hodgkin	13	212
32	48	Choledochus-Ca.	15	197
33	67	Choledochus-Ca.	-	181
34	56	Sigma-Ca.	3	194
35	62	Sigma-Ca.	-	177
36	73	Sigma-Ca.	5	196
37	48	Chondrosarkom	4	189
38	19	Osteosarkom	2	160
39	11	Ewing-Sarkom	-	244
40	78	Prostata-Ca.	-	110

Die Patienten, bei denen Auffahrungen zwischen Diagnosestellung und Untersuchung
 ter, wurden sofort nach Bekanntwerden des malignen Charakters

2. Gewinnung der Leukozyten

Nach Säuberung des Ohrläppchens mit Äther wurde durch Einstechen mit einer Impflanzette ein Blutropfen auf einen chemisch reinen Objektträger gebracht, dünn ausgestrichen und eine Stunde luftgetrocknet.

Zur Hämolyse der Erythrozyten und Entfernung des in ihnen enthaltenen zinkpositiven Materials wurden die Ausstriche vor dem Anfärben 2-3 mal rasch in zinkfreies, bidestilliertes Wasser getaucht. Dadurch werden zink- und eisenhaltige Substanzen entfernt, die den Färbeprozess in den Leukozyten beeinträchtigen können (63), wobei insbesondere die (zinkhaltige) Carboanhydrase und (eisenhaltiges) Hämoglobin in Frage kommen. Durch diese experimentell in Vorversuchen zuverlässig erprobte Methode (12, 59, 63) konnte auf die Herstellung von Leukozytenkonzentraten verzichtet werden. Von jedem Patienten wurden 6 Blutausrichie derart zur Färbung vorbereitet.

3. Färbemethode

Die zur Herstellung der Farblösungen benutzten Glasgeräte und die Objektträger wurden zunächst mit Wasser, Seife und Bürste gut gereinigt und anschließend dreimal in Aqua bidest. gespült. Sie wurden dann in einer 2 n-HCL über Stunden belassen und nach Herausnahme ausreichend mit zinkfreiem Wasser nachgewaschen, bis der Indikator die Entfernung der Säure anzeigte. Die zur Herstellung von Blutausrichien benötigten Objektträger wurden in Alkohol-Äther-Lösung aufbewahrt und vor Gebrauch zusammen mit den übrigen Glasgeräten in sterilen Tüchern eingewickelt und im Brutschrank getrocknet.

Da der Farbnachweis für intrazellulär gelegenes Zink über eine Dithizon-Komplexbildung nur unter Berücksichtigung spezifisch-chemischer Voraussetzungen zuverlässige Resultate ergibt, wird nachfolgend über das Dithizon und seine Reinheitskriterien folgendes ausgeführt:

Das Dithizon-Diphenylthiocarbazon ist ein wasserunlösliches, in Chloroform, Kohlenstofftetrachlorid, konzentrierter Schwefelsäure, verdünnter Alkalilauge sowie Azeton lösliches, in Alkohol und Äther schwer lösliches, schwarz-violettes, kristallines Pulver, mit einem Molekular-Gewicht von 256,32, das gelöst eine grüne Farbe annimmt.

Wie erstmals von FISCHER (27) zum Nachweis von Schwermetallionen benutzt.

Die mit Dithizon reagierenden Schwermetalle, allgemein Dithizonmetalle genannt, bilden in wässrigen Lösungen schwerlösliche Sulfide und stehen im Periodensystem eng beieinander (Abb. 1).

Abb. 1

Übersicht der Dithizonmetalle im Periodensystem

VII a	VIII	I b	II b	III b	IV b	V b	VI b
Mn	Fe Co Ni	Cu	Zn				
	Pd	Ag	Cd	In	Sn		Te
	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po

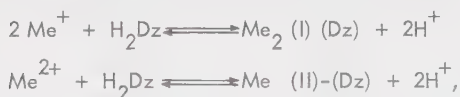
Aus IWANTSCHIEFF, G.: Das Dithizon und seine Anwendung in der Mikro- und Spurenanalyse (45).

Man nimmt heute an, daß das H-Ion der Ketoform durch das Metallion ersetzt wird. Hierbei können zwei verschiedene Metalldithizonate gebildet werden, das primäre und das sekundäre, die sich durch ihre Färbung unterscheiden. Die sekundären Dithizonate werden bei höheren ph-Werten gebildet als die primären oder bei Unterschuß an Dithizon.

Die primären Dithizonate bilden sich nach der Gleichung:



die sekundären nach der Gleichung:



wobei H_2Dz = Dithizon und Me = Metall bedeutet.

Dithizon ist wenig selektiv und erfaßt im allgemeinen mehrere Kationen gleichzeitig. Durch Einhalten eines bestimmten ph-Bereiches und durch Zusatz geeigneter Maskierungsgemische kann jedoch eine ausreichende Selektivität erreicht werden (27). Für Zink ist diese Möglichkeit nahezu optimal gegeben: bei einem ph von 4 - 5 in Gegenwart von Cyanid und Thiosulfat ist der Zink-Nachweis mit Dithizon nahezu spezifisch, es bildet sich das purpurrote Zink-Dithizonat mit typischem Absorptionsspektrum (vgl. S. 16) (27, 67, 68, 86, 99, 103).

Ein generell nur als rotgefärbt bezeichnetes Metalldithizonat ist jedoch für Zink nicht spezifisch, da eine Reihe von anderen Metallen ebenfalls in Rottönen mit Dithizon-Komplexverbindungen eingehen. Einen Überblick der Dithizonverbindungen gibt Tabelle IV.

Dithizon ist leicht oxydierbar zu Diphenylthiocarbodiazon, welches in organischen Lösungsmitteln gut löslich ist und eine gelbe bis braune Farbe aufweist.

Um sicheren Licht- und Luftabschluß zu gewährleisten, muß die Dithizonlösung daher in braunen Flaschen im Kühlen (+ 4°C) aufbewahrt werden.

Tabelle IV

Zusammenstellung der Farbreaktionen aller Dithizonmetalle mit optimalem pH-Bereich

Kation	Komplex	Extraktion bei pH	Lösungsmittel	Farbe	Löslichkeit mol/l	λ max. nm	E mol
—	Dithizon H ₂ Dz	—	CCl ₄ HCCl ₃	smaragdgrün blaugrün	$2,1 \cdot 10^{-3}$ $> 10^{-2}$	620 605	32800 40000
Ag	Ag [HDz]	1 - 7	CCl ₄	gelb	$> 2 \cdot 10^{-3}$	462	30500
Au	Au [HDz] ₃	~ 2	HCCl ₃	goldgelb	$\sim 1 \cdot 10^{-5}$	~ 450	~ 24000
	Au ₂ [Dz] ₃	~ 8	HCCl ₃	rotbraun	—	—	—
Bi	Bi [HDz] ₃	3 - 8	CCl ₄	rotorange	$1,3 \cdot 10^{-5}$	490	80000
Cd	Cd [HDz] ₂	6 - 14	CCl ₄	rosarot	$1,3 \cdot 10^{-5}$	520	88000
Co	Co [HDz] ₂	6,5 - 10,5	CCl ₄	rotviolett	$1,6 \cdot 10^{-4}$	542	59200
	Co [Dz]	13 - 14,5	CCl ₄	gelbbraun	$> 2,5 \cdot 10^{-5}$	465	9200
Cu	Cu [HDz] ₂	2 - 5	CCl ₄	rotviolett	$> 1,2 \cdot 10^{-3}$	550	45200
	Cu [Dz]	7 - 14	CCl ₄	gelbbraun	$2,1 \cdot 10^{-3}$	450	20000
Fe	Fe [HDz] ₃	7,5 - 8,5	CCl ₄	violettrot	—	—	—
Hg	Hg [HDz] ₂	1 - 4	CCl ₄	orange	$6,6 \cdot 10^{-5}$	485	71200
	Hg [Dz]	7 - 14	CCl ₄	violett	$1,3 \cdot 10^{-3}$	515	23600
In	In [HDz] ₃	5 - 6	CCl ₄	himbeerrot	$7,8 \cdot 10^{-4}$	510	87000
Mn	Mn [HDz] ₂	~ 10	HCCl ₃	braunviolett	—	—	—
Ni	Ni [HDz] ₂	6 - 9	CCl ₄	braunviolett	$1,2 \cdot 10^{-3}$	665	19200
Pb	Pb [HDz] ₂	6,5 - 10,5	CCl ₄	karminrot	$2,5 \cdot 10^{-5}$	520	68800
Pd	Pd [HDz] ₂	1 - 4	CCl ₄	fahlgrün	$4,5 \cdot 10^{-4}$	640	28800
	Pd [Dz]	~ 10,0	CCl ₄	braunviolett	$1,3 \cdot 10^{-3}$	—	—
Pt	Pt [HDz] ₂	0,5 - 4	CCl ₄	braungelb	—	710	30000
Sn	Sn [HDz] ₂	5 - 9	CCl ₄	rot	—	520	58000
Tl	Tl [HDz]	~ 14,5	HCCl ₃	rosarot	$> 1 \cdot 10^{-5}$	505	32200
Zn	Zn [HDz] ₂	6,5 - 9,5	CCl ₄	purpurrot	$> 2,8 \cdot 10^{-3}$	538	92000

Aus: G. IWANTSCHIEFF: Das Dithizon und seine Anwendung in der Mikro- und Spurenanalyse.

Um die Mengen dieses Oxydationsproduktes in den Dithizonpräparaten zu erfassen, wurden zu bestimmten Dithizon vor Ansetzen der Farblösungen in regelmäßigen Abständen auf seine Reinheit durch Ausschütteln mit verdünnter, metallfreier Ascorbinsäurelösung (etwa 0,1 n) geprüft. Eine solche Dithizonlösung (bei vor Oxydationspräparaten) ist ganz aus alkylierten

Amoniumdithizonat mit orangeroter Farbe in die wässrige Phase über, während die CCl_4 -Lösung klar und nicht wie im Falle von Oxydationsprodukten gelb bleibt. Verdünnte Dithizonlösungen sind nur kurze Zeit haltbar, konzentriertere Lösungen können unter Licht- und Luftabschluß im Kühlen monatelang und ohne wesentliche Zersetzung aufbewahrt werden.

Für die eigentlichen Färbungen wurden unter diesen Praemissen aus Chemikalien vom Reinheitsgrad "pro analysi" folgende Lösungen benutzt:

A. 0,01 % Dithizon in Azeton

B. zinkfreies Wasser

(Herstellung: doppelt quarzdestilliertes Wasser)

C. Komplex-Puffer:

Natriumthiosulfat	550,0 g
Natriumacetat	90,0 g
Kaliumcyanid	10,0 g
zinkfreies Wasser	ad 1000,0 ml

Die Lösung wird mit konzentrierter Essigsäure auf pH 5,5 eingestellt (pH - Meter) und auf 2 l mit zinkfreiem Wasser verdünnt.

Diese Pufferlösung wird dann wiederum so lange mit Dithizon- CCl_4 -Lösung ausgeschüttelt, bis die Dithizon- CCl_4 -Phase rein grün gefärbt bleibt.

D. 1 n Essigsäure

E. 20 % Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung.

Auch diese Lösung wird mit Dithizon- CCl_4 auf zinkfreien Zustand geprüft.

Zusammensetzung der Farblösungen:

1. Dithizon-Azeton-Wasser (DAW)

1,5 Teile der Lösung A werden mit 1 Teil zinkfreiem Wasser gemischt.

2. Dithizon-Azeton-Puffer (DAP)

Lösung A	48,0 ml
zinkfreies Wasser	36,0 ml
mit 1 n Essigsäure auf pH 3,7 einstellen, dazu	

Lösung C	11,6 ml
Lösung E	0,4 ml

Mit dem Dithizon-Azeton-Wasser (DAW) und dem Dithizon-Azeton-Puffer (DAP) wurden jeweils drei Ausstriche angefärbt.

Als Blindversuch wurden auch Objektträger ohne Blutausstrich angefärbt, d.h. lediglich mit der Farblösung übergossen, um eine Kontrolle der chemischen Sauberkeit zu haben. Abgeschlossen ist der Färbevorgang dann, wenn sich die grüne Farblösung auf den Präparaten nach gelb hin verfärbt, was nach spätestens ca. 10 Minuten eingetreten ist. Anschließend wurden die Präparate sofort mit zinkfreiem Wasser dreimal abgespült und zur Gegenfärbung der Zellkerne mit 0,1 % wässriger Azur II-Lösung versetzt und nach dem Trocknen in Glycerin-Gelatine eingebettet.

Im Plasma von Granulozyten, die mit der DAW-Lösung angefärbt wurden, lassen sich regelmäßig auf gelblichem Hintergrund goldbraune Granula abgrenzen. Die Kerne sind blau. Auch die Kerne der Monozyten und Lymphozyten sind blau angefärbt, ihr Plasma enthält aber keine Granula. Erythrozyten sind auf den Präparaten nicht mehr zu erkennen. Alle untersuchten Ausstriche wiesen gleiche Farbintensität der Granula und der Kerne auf, Leukozyten ohne Granula fanden sich nicht.

Mit dem DAP angefärbt zeigen die Leukozyten nur eben hellgelblich-rötliches Zytoplasma ohne Granulazeichnung. Das Zytoplasma von Lymphozyten und Monozyten erschien leicht gefönt, war aber nicht sicher rötlich.

Trotz wiederholter Überprüfungen des DAP konnten wir bei dieser Färbung im Gegensatz zu den Voruntersuchungen (4, 9, 44, 51, 55, 95, 96, 108, 109) keine Granula darstellen.

4. Zählmethode

Anleitung an SZMIGIELSKI (95, 96) wurden je Patient 100 Leukozyten ausgewertet. Ausgezählt wurden die nach unserer Methodik goldbraun gefärbten Granula neutrophiler Granulozyten jeweils in der sogenannten Ausstrichfahne des Präparates und zwar bei 1500-facher Vergrößerung (Binokular Ortolux-Mikroskop der Firma Leitz).

Nicht wurden im wesentlichen neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wurden nicht berücksichtigt.

Granulozyten mit einem Granulagehalt von 0 - 20 wurden der Klasse M_1 , Zellen mit einem Granulagehalt von 20 - 40 der Klasse M_2 zugeordnet. Die Klasse M_3 enthält

0 - 60 Granula, die Klasse M_2 >60 - 120, die Klasse M_3 >120 - 180, die Klasse M_4 >180 - 240 und die Klasse M_5 >240 Granula.

Um die Genauigkeit und die Fehlerbreite des Auszählens der Granula zu überprüfen, wurden mehrfach Kontrollzählungen veranlaßt. In einem Blickfeld markierte Leukozyten wurden dabei von fünf Laborantinnen ausgezählt, wobei sich eine Streubreite der gefundenen Ergebnisse von ± 30 ergab.

Der Zähl- und Einteilungsmodus wurde bei allen drei Vergleichsgruppen, also Frühfällen, gesicherten Carcinomträgern und Gesunden, durchgeführt. Zellen ohne Granula wurden bei Gesunden nicht beobachtet, es sei denn bei einer eindeutig beschädigten Zelle, bei der dann in unmittelbarer Umgebung die angefärbten Granula verstreut lagen. Solche Zellen wurden nicht ausgewertet.

Nach orientierendem Vergleich der mit der DAW-Lösung angefärbten Ausstriche wurden je Ausstrich 100 Leukozyten ausgezählt.

5. Ergebnisse

Von 16 Gesunden wurden die Granula aus je 100 Granulozyten ausgezählt. Je nach Granulagehalt erfolgte die Zuordnung dieser Granulozyten in die Klassen $M_1 - M_5$. Aus der Häufigkeitsverteilung dieser 100 Leukozyten (auf die Klassen $M_1 - M_5$) wurde für jede Person die durchschnittliche Granulazahl $\bar{x}$ mit der Standardabweichung s errechnet. Aus den 16 so gewonnenen Mittelwerten $\bar{x}_1 - \bar{x}_{16}$ ließ sich anschließend der durchschnittliche Mittelwert $\bar{X}$ (G) mit der Standardabweichung $\bar{s}$ (G) bestimmen.

Als Normwert ergibt sich somit ein $\bar{X}$ (G) von $182 \pm 52,4$ (Tabelle V).

Die Einteilung der Leukozyten von 40 Carcinomträgern erfolgte in gleicher Weise in die Klassen $M_1 - M_5$, eine Übersicht enthält Tabelle VI. Als durchschnittlichen Mittelwert wird hier für $\bar{X}$ (Ca) $186 \pm 77,1$ ermittelt.

Auch die gynäkologischen Frühfälle werden in die Klassen $M_1 - M_5$ nach ihrem Granulagehalt eingeteilt, die Ermittlung des durchschnittlichen Mittelwertes ergibt für $\bar{X}$ (F) $185 \pm 61,1$ (siehe Tabelle VII).

Tabelle V

Zusammenstellung der Score-Werte von 16 Gesunden aus je 100 Leukozyten

Pat.-Nr.	Score-Klassen $M_1 - 5$					N	$\bar{x}$	s
	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5			
	0-60	>60-120	>120-180	>180-240	>240-300			
1	6	9	40	35	10	100	170	59,6
2	2	18	34	40	6	100	168	54,0
3	-	14	30	42	14	100	184	52,3
4	-	10	12	62	16	100	201	45,9
5	-	4	50	29	17	100	185	50,5
6	4	13	37	42	4	100	168	51,2
7	3	17	39	41	-	100	161	48,6
8	1	12	48	30	9	100	170	51,2
9	-	1	49	36	14	100	188	42,9
10	4	8	33	41	14	100	184	50,5
11	3	3	45	39	10	100	180	49,7
12	2	7	28	47	16	100	191	57,0
13	2	11	37	41	9	100	177	51,2
14	1	9	35	47	8	100	181	49,6
15	-	10	39	41	10	100	181	47,0
16	-	13	31	43	13	100	184	50,5
Insgesamt:	28	160	587	656	170	1600	182	52,4

$\bar{x}$ = Mittelwert jedes einzelnen Falles mit der entsprechenden Standardabweichung s.

Für durchschnittliche Mittelwert für Gesunde $\bar{X} (G)$ wird mit $182 \pm 52,4$ bestimmt.

Tabelle VI

Aufteilung der Leukozyten von 40 Carcinomträgern nach dem Score-Gehalt in die Klassen M_1 bis M_5

Pat.-Nr.	Score-Klassen $M_1 - 5$					N	$\bar{x}$	s
	M_1 0-60	M_2 >60-120	M_3 >120-180	M_4 >180-240	M_5 >240-300			
1	7	-	21	29	43	100	210	63,6
2	-	17	19	38	26	100	180	94,8
3	-	11	15	41	23	100	181	79,8
4	3	9	56	21	11	100	200	65,0
5	8	12	13	31	36	100	185	98,0
6	2	8	17	47	26	100	202	57,9
7	-	15	11	43	31	100	204	60,5
8	1	11	10	58	20	100	201	54,6
9	-	9	20	41	30	100	211	56,0
10	2	7	11	45	35	100	213	45,8
11	-	21	28	14	37	100	191	65,8
12	-	16	19	30	35	100	200	67,1
13	5	23	7	38	27	100	185	75,5
14	-	8	28	46	18	100	194	52,2
15	4	7	14	17	58	100	221	70,1
16	-	11	21	48	20	100	196	77,3
17	11	17	45	24	3	100	142	66,9
18	-	19	39	36	6	100	167	51,8
19	9	19	37	10	25	100	164	77,3
20	-	4	12	50	34	100	218	48,5
21	11	8	17	43	21	100	181	80,1
22	3	17	22	40	18	100	182	63,2
23	4	11	19	30	36	100	200	67,9
24	-	19	33	39	9	100	173	52,8
25	-	18	21	45	16	100	185	58,7
26	-	15	20	41	24	100	194	60,6
27	8	20	23	29	30	100	160	96,3
28	1	20	14	42	23	100	186	65,4
29	3	12	26	18	41	100	199	71,3
30	1	23	30	27	19	100	174	64,0
31	-	3	5	78	14	100	212	32,1
32	-	-	29	63	8	100	197	37,0
33	-	2	45	53	-	100	181	30,0
34	-	-	42	43	15	100	194	52,3
35	3	10	33	47	7	100	177	52,5
36	-	-	38	48	14	100	196	39,1
37	-	3	28	56	13	100	189	57,1
38	-	11	62	27	-	100	160	33,5
39	-	-	2	39	59	100	244	34,8
40	7	23	40	31	9	100	110	62,8
Insgesamt	93	459	937	1571	940	4000	186	77,1

*) Anmerkung: Jedes einzelne Falles mit der entsprechenden Anmerkung.

Der durchschnittliche Mittelwert $\bar{X}$ (Ca) für Carcinomträger beträgt $186 + 77,1$.

Tabelle VII

Aufteilung der Leukozyten von 14 Patientinnen mit gynäkologischen malignen Frühstadien nach dem Scoregehalt in die Klassen M_1 - M_5

Pat.-Nr.	Score-Klassen M_1 - 5					N	$\bar{x}$	s
	M_1 0-60	M_2 >60-120	M_3 >120-180	M_4 >180-240	M_5 >240-300			
1	-	18	28	43	11	100	178	55,1
2	11	21	34	27	7	100	149	65,4
3	-	20	20	38	22	100	187	62,8
4	5	7	22	47	19	100	190	64,1
5	3	27	38	28	4	100	152	55,0
6	9	17	41	21	12	100	156	66,2
7	-	9	37	36	18	100	188	52,3
8	-	7	11	61	21	100	207	48,1
9	6	11	23	27	33	100	175	65,6
10	-	10	37	48	5	100	179	44,2
11	-	-	4	65	31	100	226	33,5
12	-	13	20	39	28	100	199	59,6
13	-	11	13	59	17	100	199	51,2
14	2	9	17	43	29	100	203	59,6
Insgesamt:	36	200	345	572	247	1400	185	61,1

* Mittelwert jedes einzelnen Falles mit der entsprechenden Standardabweichung s.

Der durchschnittliche Mittelwert für maligne Frühstadien beträgt $\bar{X}$ (F) = $185 \pm 61,1$.

IV. DISKUSSION

Die eingangs erwähnten Untersuchungsergebnisse zur sog. Frühdiagnose carcinomatöser Prozesse waren entscheidender Anlaß, die Zink-Bestimmung in den Leukozyten auch bei unserem Krankengut durchzuführen.

Der bekannt hohe Zink-Gehalt der Leukozyten, die Abnahme dieses Zink-Gehaltes bei Leukämien und die bedeutende Rolle des Zinks als Enzymbestandteil bzw. Co-Faktor ließen die Erwartung zu, im Sinne einer Krebsfrühreaktion signifikante Abweichungen von der Norm aufzufinden.

Stellt man weiterhin an eine Krebsfrühreaktion die Bedingungen der einfachen Handhabung, der leichten Reproduzierbarkeit und der hohen Empfindlichkeit, so schienen auch diese Voraussetzungen gegeben.

Tabelle VIII zeigt die bisher angegebenen Normen mehrerer Untersucher mit den pathologischen Abweichungen bei verschiedenartigsten Erkrankungen, die eigenen Ergebnisse sind ebenfalls angeführt. Danach liegen die Normwerte des mittleren Granulagehaltes der Granulozyten zwischen 172 und 200 Einheiten.

Alle bei Malignomen gefundenen Erniedrigungen liegen deutlich unterhalb dieser Grenze. Es besteht weiterhin übereinstimmend kein Zusammenhang zwischen Granulagehalt der Leukozyten, Lokalisation, Art und Ausdehnung des Tumors (4, 9, 44, 51, 55, 95, 96, 108, 109).

Aus diesen Daten leiteten die Voruntersucher eine Störung eines "zinkhaltigen Enzyms in den Granulozyten" ab, die sie als Ausdruck einer generellen Schädigung des Tumorträgers interpretierten. Dies um so mehr, als ähnliche Granulaveränderungen bereits bei Präkanzerosen und damit bereits vor einem klinisch faßbaren Ausbruch eines malignen Prozesses nachweisbar sein sollten.

Zu diesen Ergebnissen bzw. Voruntersuchungen ist nach den eigenen Untersuchungsergebnissen folgendes auszuführen:

A. Normwerte

Der bei BRUNNER und FRÜHWALD (9) nicht näher begründete Normwert von 200 Granula je Zelle deckt sich größenordnungsmäßig mit den eigenen Ergebnissen und dem von ALLEN (4), ZUR HORST-MEYER (44), KOSŁOWSKI (51), LAWOWICZ (55), SZMIGIELSKI (95, 96), WEISE (108, und WOŁAŃSKY (109), die alle die sog. Scott-Methode (10) SZMIGIELSKI (95, 96) anwandten.

Tabelle VIII

Übersicht der Ergebnisse nach der Score-Methode

Autoren	n Krankengut	Path.	Norm	Färbemethode
BRUNNER u. FRÜHWALD (9) 1966	50 Ca. d. HNO-Bereichs 40 internist. Erkrankg.	<200 >200	>200	DAW
SZMIGIELSKI u. LITWIN (95) 1964	18 Chron. Myelose 14 akute Myeloblastenl. 9 multipl. Myelom 9 Hodgkin 8 Myelosklerose 4 chron. lymph. Leukämie 10 Gesunde	101,1 72,4 54,4 108,0 213,5 199,5	178,5	nach MC NARY
SZMIGIELSKI u. LITWIN (96) 1965	50 Ca. aller Bereiche 50 internist. Erkrankg.	14 - 128 185,7 - 209	178,5	nach MC NARY
LAWKOWICZ u. a. (55) 1966	60 malign. Bluterkrankg. 100 Ca. aller Bereiche 15 Gesunde	87,5 111,6	182	nach MC NARY
KOZŁOWSKI, J. (51) 1967	69 Primäre Hautneopl. Fortgeschrittene	36 - 150 0 - 59		nach MC NARY
WEISE, W. u. WOLANSKY (108) 1971	12 Cervix-Oberflächenca. 84 Collum-Ca. 28 Gesunde	154 80	181	nach MC NARY
WOLANSKY, D. u. WEISE, W. (109) 1971	27 Ca. corpus uteri 6 Ovarial-Ca. 84 Collum-Ca. 28 Gesunde	111 96 80	181	nach MC NARY
ZUR HORST-MEYER H. u. BORCHARD, N. (44)	15 Gesunde 30 Basaliome 60 Mathopathien 60 Mamma-Ca.	129,3 130 147,4	172,3	nach MC NARY
ALEX, R. u. ZUR HORST-MEYER (4) 1968	15 Gesunde 42 Cervix-Ca. 8 Ovarial-Ca.	119,8 116,4	173,6	nach MC NARY
Eigene Ergebnisse	14 Gesunde 40 Ca. aller Bereiche 14 Cervix-Oberflächen- Carcinome	186 185	182	DAW DAW DAW

Diese Score-Methode dient im übrigen nur zur grobquantitativen Einteilung der Leukozyten nach der Dichte der angefärbten Granula in insgesamt fünf Gruppen: Zn 0, Zn 1 usw. bis Zn 5. Voraussetzung allerdings ist - wie weiter unten ausgeführt - die Anfärbung mit DAW, d.h. ohne den zinkspezifischen Pufferzusatz.

Zur Veranschaulichung dieser Gruppierungen sind in der Übersicht von SZMIGIELSKI (94) aus jeder Gruppe angefärbte Granulozyten mit verschiedener Granuladichte wiedergegeben, ungefähre Granulazahlen je Gruppe fehlen, auch wenn in den Ergebnissen sogar Dezimalstellen erscheinen. Es wird nicht angegeben, ob die Einteilung der je Patienten ausgewerteten 100 Leukozyten in die Gruppen durch optischen Vergleich oder durch Auszählen der Granula erfolgte.

Wir haben die Ungenauigkeit dieses Auszählens von vornherein berücksichtigt und fünf Klasseneinteilungen vorgenommen mit einer Streubreite von ± 30 Granula.

Die Einteilung der Leukozyten nach ihrem Score-Merkmal in Klassen bedeutet sicher einen Informationsverlust, auf der anderen Seite wiegen dadurch aber Ables- bzw. Auszählfehler nicht so schwer, was bei der oftmals verwirrenden Homogenität der Granulamassen eintreten kann.

Zudem erhebt diese Methode lediglich den Anspruch auf orientierende, semiquantitative Aussagekraft, ob eine Verminderung zu einem festgelegten Normalmaß besteht.

Die Klasse M_1 enthält Leukozyten mit dem Granulagehalt 0 - 60 mit der Klassenmitte $x_1 = 30$, für die Klasse M_2 gelten die Maße 60 - 120 und $x_2 = 90$, für Klasse M_3 >120 - 180 und $x_3 = 150$, für die Klasse M_4 >180 - 240 und $x_4 = 210$ und für Klasse M_5 >240 - 300 Granula und $x_5 = 270$.

Der Mittelwert $\bar{x}$ e Person wird berechnet, indem man die plausible Annahme macht, daß die zur gleichen Klasse gehörigen f_i -Werte im Durchschnitt annähernd mit der jeweiligen Klassenmitte x_i ($i = 1 - 5$) übereinstimmen. Demnach ist

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^M \sqrt{x_i \cdot f_i} \cdot \frac{1}{N}$$

wobei M = Anzahl der Klassen, x_i = Mittelwerte der Klassen und f_i = Häufigkeiten $\times 8$ (in $\bar{x}$ verteilten) Mit s wird die Standardabweichung je Person ausgedrückt, 100 Granulozyten pro Person, Standardabweichung bestimmt.

Der Mittelwert $\bar{x}$ der 100 Granulozyten einer Person ist der Durchschnitt aller Mittelwerte $\bar{x}_i$ (0, 1, 2, 3, 4, 5) von 100 Granulozyten pro Person, die Mittelwerte $\bar{x}_i$ sind

der gleichzeitig mit der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten CV.

Die Aussagekraft des $CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$ besteht darin, daß sie die Homogenität einer statistischen Masse wiedergibt (49).

Ein CV von 10 % beinhaltet eine relativ geringe Streuung, dagegen deutet ein CV von 80 % auf eine starke Streuung und damit auf eine erhebliche Inhomogenität hin. Der von uns festgestellte CV von 28,8 % läßt also auf eine relativ einheitliche statistische Masse schließen.

Zur Festlegung des Normwertes hatten sich 16 gesunde Personen - Kollegen und Krankenschwestern im Alter von 18 - 34 Jahren - zur Verfügung gestellt, diese Personen wiesen auch nach einer Folgezeit von 2 Wochen keinerlei Erkrankungen auf, insbesondere keinerlei fieberhafte Infekte, lokale Entzündungen, Stoffwechselentgleisungen oder Leberaffektionen. Diese besonderen Forderungen mußten berücksichtigt werden, da bekannt ist, daß lokale Entzündungen und fieberhafte Infekte zu einer Erhöhung des Serum-Zink-Wertes und des Leukozyten-Zink-Gehaltes führen (36, 60, 116); ZUR HORST-MEYER (44) fand mit der Score-Methode im Gegensatz zu dem von ihm entwickelten Normwert von 187,8 bei akuten Entzündungen Werte von 199 Scores und bei chronischen Entzündungen Werte von 197 Scores. Diese Ergebnisse wurden von SZMIGIELSKI (95) bestätigt.

Bei den Stoffwechselerkrankungen wurden besonders die diabetischen Entgleisungen beachtet. So fanden MÄHR und PAULSEN (60) mit hoch differenzierten chemisch-analytischen Verfahren nur vereinzelt bei Diabetikern bei Blutzuckerwerten von über 250 mg% eine Erhöhung des gesamten Leukozyten-Zink-Gehaltes, während die Serum-Zink-Konzentration immer signifikant erhöht gefunden wurde.

Interessant sind aber auch Angaben von DAVIES (18, 19), der nach oraler oder intravenöser Verabreichung von Glukose einen deutlichen Abfall des Serum-Zink-Gehaltes fand. Die Blutentnahmen bei unseren Patienten wurden daher jeweils am nüchternen Patienten durchgeführt.

Unter Berücksichtigung dieser Statistiken fanden wir bei 16 Gesunden einen durchschnittlichen Mittelwert von $\bar{x} = 182 \pm 52,4$ Scores, bei der 1-s-Regel entfallen also auf 68,3 % aller Leukozyten (s. 18) bis 234 Granula und auf 75,5 % aller Leukozyten (2-s-Regel zwischen 78 und 286 Granula.

Der Vergleich der Normwerte der Leukozytengranulationen nach der Score-Methode von SZMIGIELSKI (95) mit den durchschnittlichen Mittelwerten ein recht einheitliches Bild, lediglich die große Streubreite unserer Untersuchungen fällt auf.

Unsere letztlich errechnete Streubreite von ± 52 deckt sich aber größenordnungsmäßig mit der tatsächlich durch verschiedene Untersucher festgestellten Streuung von ± 30 bei einem Granulagehalt eines markierten Leukozyten von 150.

Da bei der Auszählung von 100 Leukozyten je Blutaussstrich nicht immer die Gewähr der exakten Auszählung gegeben ist, muß die Streubreite zwangsläufig steigen, wenn man bei allen sog. normalen Leukozyten einen wahren theoretischen Mittelwert fordern will, um den sich alle Meß- oder Schätzwerte normal verteilen.

B. Spezifität der Methodik

Die fast einheitlichen Normalwerte aller Untersucher deuten vordergründig auf analoge Versuchsbedingungen und methodische Kriterien hin. Wir konnten jedoch trotz mehrfacher Überprüfungen der Farblösungen mit dem zinkspezifischen Dithizon-Komplexpuffer in den Leukozyten Granula nicht darstellen und fanden unsere Normalwerte - wie auch BRUNNER und FRÜHWALD (9) - lediglich durch Anfärben mit dem DAW. Alle Untersucher - mit Ausnahme von FRÜHWALD und BRUNNER - beziehen sich methodisch ausdrücklich auf die Ursprungsarbeit von MC NARY (63), ohne allerdings detaillierte Angaben zur eigentlichen Färbemethode anzugeben (Tabelle VIII, Seite 24).

Um so überraschender waren dann die eigenen Versuche mit dem von MC NARY (63) im Originaltext angegebenen DAP, mit denen sich in den Granulozyten keinerlei Granula darstellten.

MC NARY beschreibt zwei verschiedene Anfärbungen der Leukozyten, einmal mit dem DAW und zum anderen mit dem DAP.

Die histochemische Darstellung des Zinks mit Dithizon ist - wie im experimentellen Teil ausführlich beschrieben - nur unter bestimmten Versuchsbedingungen für Zink spezifisch, eine Praemisse, die von allen Voruntersuchern offenbar übersehen wurde. Dabei hatte MC NARY in seiner Originalarbeit ausdrücklich auf im physiologischen Milieu anzutreffende Störfaktoren - insbesondere die zahlreichen Schwermetalle - hingewiesen und daher die Färbemethode mit dem DAW-Gemisch zur speziellen Zink-Darstellung in Granulozyten verworfen.

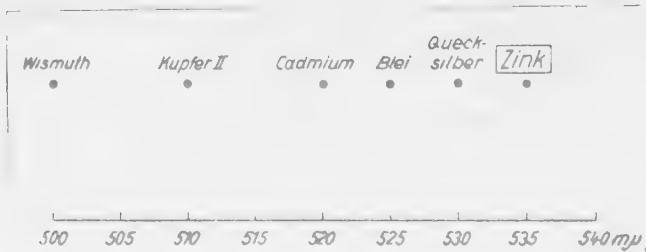
Er beschrieb jedoch, daß sich regelmäßig bei dieser Färbemethode im Plasma goldbraune Granula, die er nicht näher definierte, nachweisen ließen, eine Beobachtung, die nur wir und vermutlich alle anderen Voruntersucher machten. Bei einem einzigen, von ihm im Verlauf seiner Untersuchungen angefärbten leukämischen Blutaussstrich glaubte MC NARY (63), eine gewisse Verminderung dieser Granula in den Leukozyten der capillaren Phase

ten gefunden zu haben, was letztlich Anstoß für alle weiteren Untersuchungen wurde. Beim Anfärben von Blutausstrichen mit dem für Zink spezifischen Dithizon-Komplex-Puffer färbten sich jedoch die Granula nicht an, statt dessen beobachtete MC NARY (63) unter diesen Versuchsbedingungen ein gelblich-rötliches Plasma, einen Befund, der sich mit den hier wiedergegebenen Beobachtungen deckt. Das heißt aber, daß das Leukozyten-Zink zytoplasmatisch diffus verteilt und nicht den unter Verwendung nichtzinkspezifischer Färbemethoden nachweisbaren Granula zuzuordnen ist.

Auch VALLEE (99), der erstmals den hohen Zink-Gehalt der Leukozyten erwähnte, beschrieb nach Maskierung anderer Schwermetalle mit dem von FISCHER (27) entwickelten Komplexpuffer ein rotes Zink-Dithizonat, das er mit Tetrachlorkohlenstoff extrahierte und spektralanalytisch untersuchte (100).

Die für alle Metaldithizonate festliegenden Absorptionsmaxima sind in der nachfolgenden Abbildung wiedergegeben.

Abb. 2



Absorptionsmaxima mit Dithizon reagierender Metalle.

Zinkdithizonat bei $l = 535 \text{ nm}$.

Lösungsmittel: Tetrachlorkohlenstoff.

Aus: E. STAMPEL: Die intrazitrate histochemische Darstellung des Zinks durch Dithizon (91).

Die genaue Festlegung der Absorptionsmaxima zugeordnet die sichere Bestimmung eines Wertes möglich, da wie aus Tabelle IV S. 14 zu ersehen ist verschiedene Metallkomplexreaktionen farbenmäßig im visuell rötlichen Bereich liegen.

Die genaue Festlegung der Absorptionsmaxima zugeordnet die sichere Bestimmung eines Wertes möglich, da wie aus Tabelle IV S. 14 zu ersehen ist verschiedene Metallkomplexreaktionen farbenmäßig im visuell rötlichen Bereich liegen.

histophotometrisch (111) oder absorptionsspektralanalytisch der Beweis dafür erbringen läßt (60, 86, 99, 191, 112, 114).

Die Untersuchungen von MAGER (59) und STERNBERG (92) stehen dem nicht entgegen, da bei ihnen unter anderem extrem hohe Zink-Konzentrationen entscheidend gewesen sein dürften, sowie andere Gewebe (Dünndarm etc.) untersucht wurden.

Interessant sind dazu Arbeiten von WOLFF (91, 111, 112, 114, 116), der darüberhinaus nach intravenöser Verabreichung von Dithizon ähnliche Befunde an Pankreasschnitten erheben konnte.

Unter Berücksichtigung all dieser Kriterien, wie auch der eigenen Versuchsergebnisse, muß unterstellt werden, daß die von den meisten Voruntersuchern unter Verwendung von DAW nachgewiesenen intraleukozytären Granula keine zinkspezifischen Elemente darstellen.

C. Interpretation der sogenannten zinkpositiven Granula

Welche Bedeutung dem sogenannten zinkpositiven Material, den Scores (95, 96) oder den sogenannten Einheiten (44), in den Leukozyten zukommt, muß vorerst hypothetisch bleiben. Sicher ist nur, daß sie nicht zinkspezifische Elemente sind oder gar granulierte intracytoplasmatische Anreicherungen zinkhaltigen biologischen Materials darstellen. Immerhin fällt aber auf, daß alle Blutzellen, in denen sich mit dem DAW Granula darstellen lassen, die von den Voruntersuchern mit Zink in Zusammenhang gebracht wurden, auch mit der routinemäßig bewerkstelligten MAY-GRUNWALD-Färbung als granulierte Zellen bekannt sind. Die Zellen dagegen, die kein "zinkpositives Material" enthalten, also mit der Zinkfärbung homogenes Cytoplasma aufweisen, erscheinen auch nach der normalen Blutstrichfärbung homogen.

In einer neueren Untersuchung (117) wiesen Dithizon-Färbung die weißen Zellen Granula, waren also in diesem Sinne "zinkhaltig", die der myeloischen Reihe, d. h. den Eosinophilen, Neutrophilen, Monozyten und Monozyten, Kerne "Zink-Granula" (118) und Lymphozyten, Lymphozyten, Plasmazellen, Erythrozyten und Erythrozyten enthalten (37, 59).

Diese Interpretation der Granula kann die Dithizon-Zinkfärbung in Kombination mit der granulierten Zellfärbung (118) als nicht, da in einem Kontrollversuch nicht mehr nur auch durch die Peroxydasereaktion erreicht werden kann.

Diese Darstellung des Versuchsaufbaus, unter anderem, ist Teil eines größeren

zönfärbung mit den peroxydasepositiven Zellen gibt die Aufgliederung der verschiedenen Blutzellen in Tabelle IX wieder, darüberhinaus wird in dieser Tabelle auch die Anfärbbarkeit mit der MAY-GRÜNWALD-Lösung berücksichtigt.

Die Parallelität der Granulavorkommen in den verschiedensten Blutzellen mit den drei Färbemethoden ist auffällig. Zellen, die mit der Dithizon-Methode kein "zinkpositives Material" wiedergeben, sind interessanterweise auch peroxydasenegativ und weisen bei der einfachen MAY-GRÜNWALD-Färbung keine Granula auf.

Auf der anderen Seite sind aber - mit Ausnahme des Promyelozyten - alle dithizonpositiven Granula auch peroxydasepositiv.

Diese überraschende Parallelität fiel auch bereits MC NARY (63) auf und er empfahl die DAW-Lösung zur Trennung der myeloisch-monozytären Gruppe von der lymphozytären Reihe der Peroxydasereaktion - die umständlich zuzubereiten und zu handhaben sei - vorzuziehen; eine Erklärung des hier abgehandelten Phänomens der Granuladarstellung unter Anfärbung mit der DAW-Lösung gab MC NARY allerdings nicht.

Berücksichtigt man, daß das Dithizon leicht zu gelbbraunem Diphenylthiocarbodiazon oxydiert werden kann, so erscheint folgende Erklärung naheliegend:

In den zur DAW-Färbung benutzten stark verdünnten Lösungen (0,01 %ig), die zudem noch auf die Hälfte mit zinkreichem Wasser versetzt sind, müssen Oxydationsprozesse nahe-liegend sein, da die betreffenden Versuche nicht unter Luft- und Lichtabschluß vollzogen werden. Ganz besonders entscheidend dürften aber die in den Granulozyten vorhandenen Oxydasen und Peroxydasen sein, die diese Oxydation des Dithizon noch begünstigen.

Damit ließen sich letztlich die in den bekannten peroxydasepositiven Zellen nach Dithizonfärbung auftretenden gelbbraunen Granula durch oxydiertes Dithizon (dem Diphenylthiocarbodiazon) erklären.

Als letzten Fall aber sind die von den zahlreichen Voruntersuchern gefundenen gelbbraunen Granula mit dem Zink der Zellen identisch.

Auch quantitative Gesichtspunkte lassen kaum eine andere Erklärung zu:

Es ist bekannt (25, 26, 31), daß der Zink-Gehalt der Lymphozyten in der Regel ca. 50 % des Granulocyte-Zink beträgt, sofern die Bestimmungen chemisch-analytisch erfolgten.

Unter Berücksichtigung der oben erwähnten Befunde einer Reihe von Voruntersuchern mit der DAW-Färbung (s. Tabelle IX) "linke" Granula in Granulozyten nachweisen konnten, sowohl der Granulozyten-Zink als auch des "linken" Material bereits auf die Hälfte der Norm Granulozyten-Zink (s. Tabelle IX) der "linken" des Lymphozyten entsprechen.

würde (die andererseits ja angeblich nach der Dithizon-Wasser-Methode immer "zinknegativ" sind).

Tabelle IX

Darstellung von intraplasmatischer Granulierung bei Blutzellen durch verschiedene Färbemethoden

Zellart	Dithizon Granula	May-Grünwald Granula	Peroxydase Granula
Myeloblast	Ø	Ø	Ø
Promyelozyt	Ø	+	+
Myelozyt	+	+	+
Metamyelozyt	+	+	+
Juveniler Granulozyt	+	+	+
Stabkern. Granulozyt	+	+	+
Segmentk. Granulozyt	+	+	+
Mastzellen	+	+	+
Monozyt	+	+	+
Plasmazelle	Ø	Ø	Ø
Lymphoblast	Ø	Ø	Ø
Lymphozyt	Ø	Ø	Ø
Erythroblast	Ø	Ø	Ø
Erythrozyt	Ø	Ø	Ø

V. ZUSAMMENFASSUNG

Zink steht nach Eisen größenordnungsmäßig als Spurenelement des menschlichen Körpers an zweiter Stelle, ihm kommt als Bestandteil zahlreicher Enzyme und Proteohormone eine entscheidende biologische Rolle zu (81, 86, 91, 103, 113, 114, 115).

Der höchste Zink-Gehalt menschlichen Gewebes wurde mit durchschnittlich $14,2 \pm 2,0 \mu\text{g}$ je 10^9 Zellen in den Granulozyten gefunden (22, 60, 33, 101, 114), davon sind 80 % an ein Protein gebunden, das möglicherweise Enzymnatur hat (101).

Eine signifikante Abnahme dieses hohen Leukozyten-Zinks bis um 40 % wurde bei myeloidischen und lymphatischen Leukämien beobachtet, während die Serumwerte bei den betreffenden Patienten unverändert blieben (22, 31, 33).

Diese Normwerte des Granulozyten-Zinks und die Abweichungen bei Leukämien wurden mit hochwertigen Meßmethoden durch Veraschung von Leukozytenkonzentraten und anschließender Extraktion des Zink-Anteils mit Dithizon gewonnen.

Nachdem aber in der Folgezeit scheinbar ähnliche Resultate mit weitaus leichter praktikablen Färbemethoden im Hinblick auf den Zinkgehalt von Granulozyten zur Verfügung standen, wurden zahlreiche Untersuchungen über den Zink-Gehalt der Granulozyten und dessen angebliches Absinken bei Hämoblastosen wie aber auch bei soliden Tumoren publiziert, die selbst die Möglichkeit des Einsatzes solcher Färbemethoden als sog. Krebsfrühreaktion naheulegen schienen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die von den Voruntersuchern publizierten Ergebnisse insbesondere im Hinblick auf die von ihnen verwandte chemische Methodik kritisch überprüft, wonach sich folgendes festhalten läßt:

1. Die in humanen Granulozyten mit der Dithizon-Azeton-Wasser-Gemisch dargestellten goldbraunen Granula können nicht als spezifische Reaktion auf Zink angesehen werden, da Zink-Dithizonate - wie ausgeführt - eine purpuröse Farbe haben müssen.
2. Das in alten Granulozyten meiste enthaltene Zink ist nicht cytoplasmatisch gebunden und nicht granulär lokalisiert.
3. Der Gesamtgehalt des einzelnen menschlichen Leukozyten liegt bei ca. $1,4 \times 10^{-14}$ g, was bei der mit der angegebenen Methode ermittelten Zinkkonzentration von ca. $14 \mu\text{g}$ pro 10^9 Zellen der Zinkmenge des einzelnen Leukozyten beträgt ca. $1,4 \times 10^{-14}$ g.
4. Leukozyten, die ebenfalls in verschiedener Größenordnung Zink enthalten, ergeben

mit der beschriebenen Methode keine Zink-Reaktion.

5. Unabhängig von der Interpretation des angefärbten Materials ist eine Beeinflussung durch maligne Neubildungen nicht zu beobachten gewesen.
6. Bei den von allen Voruntersuchern beschriebenen goldbraunen Granula dürfte es sich mit aller Wahrscheinlichkeit um Dithizon-Oxydationsprodukte handeln.

Abschließend erscheint die Tatsache von Bedeutung, daß bis ins Detail kritische Überprüfungen mehrfach vorangegangener Publikationen zum gleichen Thema auch dann lohnend und für unser Wissen von Vorteil sind, wenn die von den Voruntersuchern gemachten Aussagen entscheidend korrigiert und ihr Informationswert negiert werden müssen.

21. DENNES, E.,
R. TUPPER und
A. WORMALL
Biochem. J. 78, 466 (1961)
22. DENNES, E.,
R. TUPPER und
A. WORMALL
Biochem. J. 78, 578 (1961)
23. DE WYS, W. und
W.J. PORIES
Clin. Res. 17, 614 (1969)
24. DE WYS, W. et al.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 135, 17 (1970)
25. DOLEZENNE, C.
Ann. Inst. Pasteur, 33, 68 (1919)
26. FABRIZIUS, W.
Ing. Diss. Berlin (1966)
27. FISCHER, H.
Wiss. Veröffentl. Siemens-Konzern 4, 158 (1925)
28. FLASCHENTRÄGER und
LEHNARTZ
Handbuch der Physiol. Chemie, II, Teil 2, 342,
Berlin-Göttingen-Heidelberg (1959)
29. FLEIHER, G.A.
Arch. Biochem. Biophys. 61, 119 (1956)
30. FOLEY, B. u.a.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 265 (1968)
31. FREDRICKS, R.E.,
K.R. TANAKA und
W.N. VALENTIN
J. of Clin. Invest. 43, 304 (1964)
32. FRISCHAUF, H.
Wien. Zsch. inn. Med. 45, 121 (1964)
33. GIBSON, J.G.,
VALLEE, B.L. u.a.
Acta Un. int. Cancer 6, 1102 (1950)
34. GETTLER, A.O. und
R. BASTIAN
Am. J. Clin. Path. 17, 244 (1947)
- 34a. GROSSE-BROCKHOFF, F.
"Pathologische Physiologie" (1969) Springer-Verlag,
Berlin-Heidelberg-New York
35. HALSTED, J.A.
Amer. Obstet. Gynec. 105, 645 (1969)
36. HALSTED, J.A. und
J.C. SMITH
The Lancet 1, 322 (1970)
37. HELLWEGE, H.H.
Monatsschrift f. Kinderheilk. 119, 37 (1971)
38. HESS, F.
Der Internist, 4, 86 (1963)
39. HOCH, F.L. und
B.L. VALLEE
J. Biol. Chem., 181, 295 (1949)
40. HOCH, F.L. und
B.L. VALLEE
J. Biol. Chem. 195, 531 (1952)
41. HOCH, F.L. und
B.L. VALLEE
Anal. Chem. 25, 317 (1953)
42. HOLLAND, E.B. und
W.S. RITCHIE
J. Assu. Agr. Chem. 22, 333 (1939)
43. HOLTERMAN, H. und
A. HEIER
Lancet 262, 1308 (1952)

44. ZUR HORST-MEYER, H.,
N. BORCHARD und
P. WELZEL Ztschr. inn. Med. 25, 437 (1970)
45. IWANTSCHIEFF, G. "Das Dithizon und seine Anwendung"
Verlag Chemie, Weinheim (1958)
46. KAHN, A.M. und
H.L. HELWIG Am. J. clin. Path. 44, 426 (1965)
47. KEIDERLING, W. und
H. SCHARPFF Münch. med. Wschr. 437, (1953)
48. KEILIN, D. und
T. MANN Nature (London) 144, 442 (1939)
49. KELLERER, H. Statistik im modernen Wirtschafts- und Sozialleben
Rowohlts deutsche Enzyklopädie 103/104,
Hamburg: Rowohlt (1960)
50. KOCH, H.J. Cancer 10, 151 (1957)
51. KOZLOWSKI, J. Acta dermato-venerologica
Stockholm 47, 269 (1967)
52. LABBE, H. und
P. NEPREUX Progr. med. (Fr.) 41, 577 (1927)
53. LAMBERS, K. Z. clin. Med. 155, 176 (1958)
54. LAMBERS, K. II. Int. Sympos. Chemoth., Neapel (1961)
55. LAWKOWICZ, W.P. u.a. Federation Proc. 25, 809 (1966)
56. LIFSCHITZ, M.D. J. appl. Physiol. 31, 88 (1971)
57. LILLIE, R.D. Histopathol. Technic and Pract.
Histochemistry, New York, Blakiston (1954)
58. LILLIE, R.D. und
A.J. BURTNER J. Histochem. u. Cytochem. 1, 8 (1953)
59. MAGER, M.,
W.F. MC NARY und
F. LIONETTI J. Histochem. u. Cytochem. 1, 493 (1953)
60. MÄHR, G. und
H. PAULSEN Med. Welt 11, 716 (1968)
- MATHIES, J.C. J. biol. Chem. 233, 1121 (1958)
- MC CANE und
E.M. WIDDOWSEN Biochem. J. 36, 692 (1942)
- MC NARY, W.F. Blood 12, 644 (1957)
- MC QUITTY, I.T. jr. Cancer Res. 30, 1387 (1970)
- MILLS, C.F. et al. Amer. J. Clin. Nutr. 22, 1240 (1969)
- MOLOKHIA, M.M. et al. Arch. Derm. 102, 352 (1970)
- MONNIER, D. und
G. PRODHOM Analyt. Chem. Acta 30, 358 (1964)

68. MONNIER, D. und
PROD'HOM, G. Ztschr. anal. Chem. 215, 153 (1966)
69. MONTGOMERY, M.L. u.a. J. Exp. Med. 78, 151 (1943)
70. NETSKY, M.G.,
W.W. HARRISON,
M. BROWN und
C. BENSON Am. J. Clin. Patholog. 51, 358 (1969)
71. OKAMOTO, K. Trans. soc. path. Jap. 32, 94 (1942)
72. OKAMOTO, K. Trans. soc. path. Jap. 33, 247 (1943)
73. OSTEN, W. Med. Klinik 61, 1776 (1966)
74. OTSUKA, H. Cancer Res. 29, 1653 (1969)
75. PARISI, A.F. und
B.L. VALLEE Am. J. Clin. Nutr. 22, 1222 (1969)
76. PASCHEN, K. und
G. FRITZ Ärztl. Forschung 24, 202 (1970)
77. PFEILSTICKER, K. Z. Klin. Chemie 3, 145 (1965)
78. PISKAZECK, K.,
E. BILEK und
J. ROTHE Arch. Gynäk. 196, 447 (1962)
79. POSWILLO, D. E. und
B. COHEN Nature 231, 447 (1971)
80. POWELL, G.W.,
W.J. MILLER und
D.M. BLACKMON J. Nutr. (Philad.) 93, 203 (1967)
81. PRASAD, A.S. Am. J. clin. Nutr. 22, 1215 (1969)
82. RAOULT, F. und
H. BRETON Compt. rend, Acad. sc. 85, 40 (1877)
83. RECHENBERGER, J. Dtsch. Zeitschr. f. Verdauungs-Stoffwechselkrank-
heiten 18, 173 (1958)
84. GORFIEN, P.I.C. und
N.Y. BROOKLYN J. Lab. Clin. Med. 72, 213 (1968)
85. RUNGE, W.,
J. MÜLLER und
H. FERNER Z. f. Zellforschung 44, 208 (1956)
86. SCHMIDT, R. und
R. RAUTSCHKE Acta histochem. 19, 1 (1964)
87. SCHROEDER, H.A. J. chron. Dis. 18, 217 (1965)
88. SEEGER, P.G. Ars. medici 57, 234 (1967)
- 88a. SIEGENTHALER, W. "Klinische Pathophysiologie" (1970)
Thieme-Verlag-Stuttgart

89. SINHA, S.N. und
E.R. GABRIELI Amer. J. clin. Path. 54, 570 (1970)
90. SPITZY, H. und
DOSUDIL, I. Mikrochim. Acta (Wien) 1-2, 119 (1962)
91. STAMPEL, B. Acta histochem. 8, 406 (1959)
92. STERNBERG, S.S. et al. Amer. J. of Path. 47, 325 (1965)
93. SUND, H. Z. Naturwiss. Med. Grundlagenforsch. 2, 284 (1965)
94. SWENERTON, H. und
L.S. HURLEY J. Nutr. (Philad.), 95, 8 (1968)
95. SZMIGIELSKI, St. und
LITWIN, J. Cancer 17, 1381 (1964)
96. SZMIGIELSKI, St. und
LITWIN, J. Blood, 25, 56 (1965)
97. TALBOT, T.R. und
J.F. ROSS Lab. Invest. 9, 174 (1960)
98. VALLEE, B.L.,
W.L. HUGHES und
J.G. GIBSON Blood, 1, 82 (1947)
99. VALLEE, B.L. und
J.G. GIBSON J. Biol. Chem. 176, 435 (1948)
100. VALLEE, B.L. und
J.G. GIBSON J. Biol. Chem. 176, 445 (1948)
101. VALLEE, B.L. und
J.G. GIBSON Blood 4, 455 (1949)
102. VALLEE, B.L. und
M.D. ALTSCHULE Blood 4, 398 (1949)
103. VALLEE, B.L.,
G.L. HOCH und
W.L. HUGHES jr. Arch. Biochem. 48, 347 (1954)
104. VALLEE, B.L. J. Am. Med. Assoc. 162, 1053 (1956)
105. VALLEE, B.L. Physiol. Rev. 30, 443 (1959)
106. VIKBLADH, A. Scand. J. clin. a. Labor Invest. 2, 243 (1950)
107. VIKBLADH, A. Scand. J. clin. Labor. Invest. 2, 9 (1951)
108. WEISE, W.,
D. WOLANSKY und
G. AGATHA Radiobiol. Radiother. 12, 71 (1971)
- WOLANSKY, D. und
W. WEISE Zbl. Gynäk. 93, 337 (1971)
110. WOLFF, H.P. Deutsch. Arch. Klin. Med. 197, 263 (1950)

111. WOLFF, H.P.,
D. RINGLEB und
R. AMANN
Z. Ges. exp. Med. 126, 390 (1950)
112. WOLFF, H.P.
H. MASKE,
B. STAMPEL und
F. BAUMGARTEN
Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 216, 440 (1952)
113. WOLFF, H.P.
Verhandl. dtsh. Gesellsch. inn. Med. 58, 461
(1952)
114. WOLFF, H.P. und
D. RINGLEB
Z. ges. exp. Med. 124, 236 (1954)
115. WOLFF, H.P.,
J.G.H. SCHMIDT,
G. ALTHAUS und
M. KNEDEL
Z. ges. exp. Med. 127, 362 (1956)
116. WOLFF, H.P.
Klin. Wschr. 34, 409 (1956)
117. WOLFF, H.P.
Verhandl. d. Dt. Ges. für Innere Med. 70, 338
(1964)
118. WEITZEL, G.,
E. BUDDECKE und
D. KRAFT
Z. physiol. Chem. 305, 132 (1956)
119. YOSHINAGA, T. u.a.
Z. physiol. Chem. 21, 276 (1965)
120. YOSHINAGA, T. u.a.
Acta histochem. 16, 337 (1963)

Herrn Professor Dr. med. D. Mohring danke ich für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die dauernde Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

Gleichzeitig danke ich den Herren Chefärzten, Professor Dr. med. H. Junge von der Chirurgischen Klinik und Herrn Privat-Dozent Dr. med. W. Mischel von der Geburtshilflich-gynäkologischen Klinik des Oldenburgischen Landeskrankenhauses Sanderbusch für das freundliche Entgegenkommen bei der Erweiterung meines Patientenkreises.

Ferner danke ich den Schwestern und Laborantinnen des Oldenburgischen Landeskrankenhauses Sanderbusch für die stets freundliche Hilfsbereitschaft und für ihre wertvollen Hinweise.

LEBENS LAUF

13.3.1939	Geboren in Reichenberg/Sudetenland
1946	Evakuiert nach Beenhausen, Kreis Rotenburg
1946 - 1950	Volksschule in Beenhausen und Rotenburg
1951 - 1953	Jacob-Grimm-Schule Rotenburg/Fulda
1953	Umzug nach Bad Homburg v.d.H.
1953 - 1960	Gymnasium für Mädchen, Bad Homburg v.d.H.
1960	Abitur
1960 - 1963	J.W. Goethe-Universität in Frankfurt/Main
1963 - 1966	Christian-Albrechts-Universität in Kiel
1966	Medizinisches Staatsexamen in Kiel
1966 - 1967	Medizinalpraktikantin im Oldenburgischen Landeskrankenhaus in Sanderbusch
1968	Beendigung der Medizinalassistentenzeit an der Medizinischen Akademie in Lübeck und Erhalt der Approbation
1966	Eheschließung mit dem Arzt Dr. med. Theodor Neumann
1968	Geburt des Sohnes Hinrich
1969	Geburt der Tochter Ulrike
1971	Geburt des Sohnes Söhnke
1973	Geburt der Tochter Elke
seit 1970	Lehramt in 2741 Unterrichtsstunden Volkshochschule, Bad Homburg v.d.H.

